

平成 21 年 6 月 16 日現在

研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18390352
 研究課題名(和文) インテリジェント型バイオナノカプセルによる外科領域における新治療薬の開発
 研究課題名(英文) Development of novel drugs for the surgical field by intelligent bionanocapsule
 研究代表者
 上田 政和(UEDA MASAKAZU)
 慶應義塾大学・医学部・准教授
 研究者番号：50142419

研究成果の概要：

この3年間で、L粒子を用いたC型肝炎治療薬と肝細胞癌治療薬が、さらにはHBs抗原 preS1を結合させたMPCポリマーによるヒト肝細胞癌への遺伝子送達と発現とヒト肝細胞癌に特異的な抗癌剤が開発された。また、ヒトの増殖因子やサイトカインを結合させたナノカプセルによる受容体標的細胞特異的治療薬の開発も行われた。インテリジェント型バイオナノカプセルにより外科領域における新治療薬が発展する可能性が証明された。ここは、これらの成果を橋渡し研究や translational research へと展開していきたいと考えている。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2007年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2008年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
年度			
年度			
総計	15,400,000	4,620,000	20,020,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：HBs抗原、ヒト肝細胞、ナノカプセル、分子標的

1. 研究開始当初の背景

B型肝炎ウイルスがヒト肝臓に特異的に感染するのはHBs抗原にpreS1というヒト肝細胞に特異的に結合する構造を有しているからで、この性質を利用して粒子内部に封入した物質を他の細胞や血液に接触することなく目的の細胞内に注入可能である。しかも、HBs抗原L粒子は直径約100nmほどの大きさで中空粒子すなわちカプセルとして遺伝子組み換え技術により酵母で大規模生産することが可能で、いわゆるバイオナノカプセル(BNC)として機能する。この一部は既にB型肝炎ワクチンとして健康人にも投与され安全性は確立している。

ところで、このバイオナノカプセルにヒト肝細胞以外の分子標的を認識するインテリジェント機能を持たせることも可能である。すなわち、preS1が存在するからヒト肝細胞に結合するのでその部分を削除するとヒト肝細胞と結合しなくなる。しかし、その部分に増殖因子やサイトカインを提示させてやるとそれぞれの受容体を発現している細胞に、また抗体のFc部分と強固に結合するz-ztagを提示させてやると抗体をカセット式に取り替えてそれぞれの細胞膜抗原を発現している細胞に、ホーミングペプチドを提示させてやるとそのペプチドに対応した細胞に、特異的に取り込まれることになりヒト肝細胞以外の多くの特

定細胞に対する分子標的が可能となる。

また、このバイオナノカプセルの中には遺伝子や、抗癌剤をはじめとして化合物のみならずタンパクやアミノ酸、さらには近年大いに注目されているsiRNAも封入可能でC型肝炎ウイルスなどRNAウイルスの治療薬も開発可能となる。

2. 研究の目的

悪性腫瘍や移植や重症感染症など外科領域には、従来からある治療法のみでは治療成績が必ずしも十分ではない疾患が多く発生している。これらの状況を打破すべく遺伝子治療やミサイル療法などが期待されているが、細胞特異性、安全性、導入効率に優れたベクターが存在しないために足踏み状態となっており、本領域におけるブレイクスルーが望まれている。

そこで、バイオナノカプセルでアル HBs 抗原 L 粒子およびその改変粒子を、ヒト C 型肝炎治療薬、ヒト肝細胞癌治療薬、増殖因子受容体やサイトカインさらには特定の膜抗原を有する細胞に対する分子治療薬を開発することを目的として以下の項目について明らかにすることを目標に本研究を企画した。

達成目標

- (1) C 型肝炎ウイルスを切断する siRNA を封入した野生型 BNC によるヒト C 型肝炎治療薬の開発
- (2) EpCAM の mRNA を切断するし siRNA を封入した野生型 BNC によるヒト肝細胞癌に対する抗腫瘍効果
- (3) 自殺遺伝子封入 L 粒子によるヒト肝細胞癌に対する選択的抗腫瘍効果
- (4) HBs 抗原 L 粒子の preS1 を結合させてかつパクリタクセルを封入したバイオナノ粒子によるヒト肝細胞癌特異的抗癌剤の開発
- (5) HBs 抗原 L 粒子の preS1 と遺伝子を結合したバイオナノ粒子によるヒト肝細胞特異的遺伝子送達と発現
- (6) 上皮増殖因子結合バイオナノ粒子による in vitro および in vivo での増殖および腫瘍抑制効果
- (7) 抗上皮増殖因子受容体抗体結合バイオナノ粒子による増殖および腫瘍抑制効果

3. 研究の方法

詳細は、既に発表した論文に記載されているので、発表論文を参照されたい。知財の関係もあるため、ごく簡単に一部の方法を記載しておく。

(1) L 粒子を用いた C 型肝炎治療薬は、リポソームに融合させた L 粒子中に C 型肝炎ウイルスを切断する siRNA を封入して、C 型肝炎

ウイルスのレプリコンとルシフェラーゼを産生するヒト肝細胞癌に添加し、レプリコンとルシフェラーゼの産生を検討した。

(2) L 粒子を用いた肝細胞癌治療薬は、リポソームに融合させた L 粒子中に EpCAM を切断する siRNA を封入して、EpCAM を産生しているヒト肝細胞癌に添加し、ヒト肝細胞癌での EpCAM mRNA と EpCAM の産生を検討した。

(3) Herpes simplex virus thymidine kinase (HSV-tK) を封入した L 粒子をヒト肝細胞癌とヒト大腸癌を移植したヌードマウスのモデルに静脈注射したのち、ganciclovir (GCV) を静脈注射してそれぞれの推定腫瘍重量を測定した。

(4) MPC ポリマーに preS1 を結合させてパクリタクセルを封入したバイオナノカプセルを作成し、in vitro およびヒト肝細胞癌をヌードマウスに移植したモデルで増殖抑制効果を検討した

(5) MPC ポリマーに preS1 を結合させて遺伝子を結合したバイオナノカプセルを作成して、in vitro およびヒト肝細胞癌をヌードマウスに移植したモデルでヒト肝細胞癌に特異的な遺伝子の発現を検討した。

(6) ヒト上皮増殖因子を結合した MPC ポリマーを作製して、それぞれの増殖因子受容体を発現している細胞と非発現細胞に in vitro とヌードマウス移植のモデルでそれぞれの増殖抑制効果と検討した。

(7) ヒト上皮増殖因子受容体にたいする抗体を MPC ポリマーに結合させてナノカプセルを作製して、それぞれの増殖因子受容体を発現している細胞と非発現細胞に in vitro とヌードマウス移植のモデルでそれぞれの増殖抑制効果と検討した。

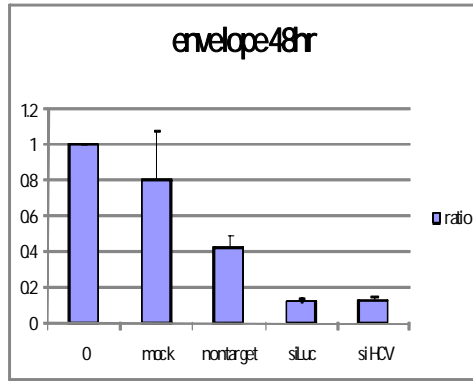
4. 研究成果

この3年間で、L 粒子を用いた C 型肝炎治療薬と肝細胞癌治療薬が、さらには HBs 抗原 preS1 を結合させた MPC ポリマーによるヒト肝細胞癌への遺伝子送達と発現とヒト肝細胞癌に特異的な抗癌剤が開発された。

また、ヒトの増殖因子やサイトカインを結合させたナノカプセルによる受容体標的細胞特異的治療薬の開発も行われた。以下には各項目についてエッセンスだけを図表にして記載するので、その詳細については、既に論文発表を行っているのでそれらを参照されたい。

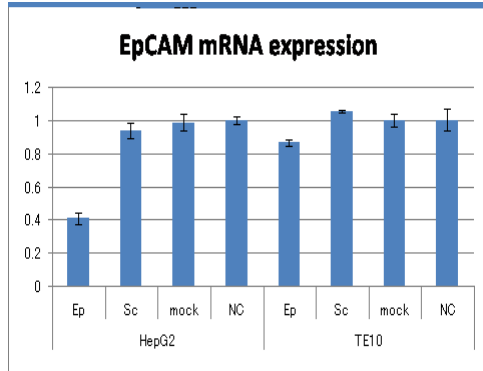
(1) C型肝炎ウイルスを切断する siRNA を封入した野生型 BNC によるヒト C型肝炎治療薬の開発

luciferase assay for 48hr using L particle

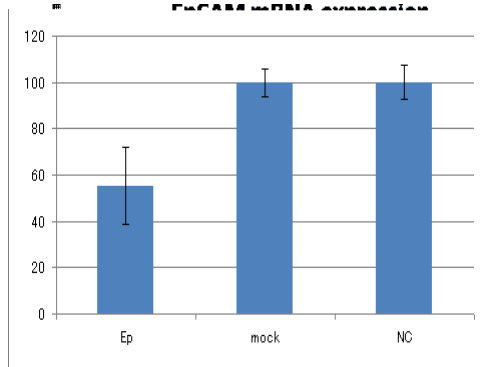


(2) EpCAM の mRNA を切断するし siRNA を封入した野生型 BNC によるヒト肝細胞癌に対する抗腫瘍効果

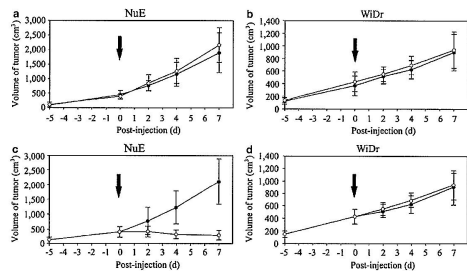
【図 1】



【図 2】



(3) 自殺遺伝子封入 L 粒子によるヒト肝細胞癌に対する選択的抗腫瘍効果



(4) HBs 抗原 L 粒子の preS1 を結合させてかつバクテリタクセルを封入したバイオナノ粒子によるヒト肝細胞癌特異的抗腫瘍剤の開発

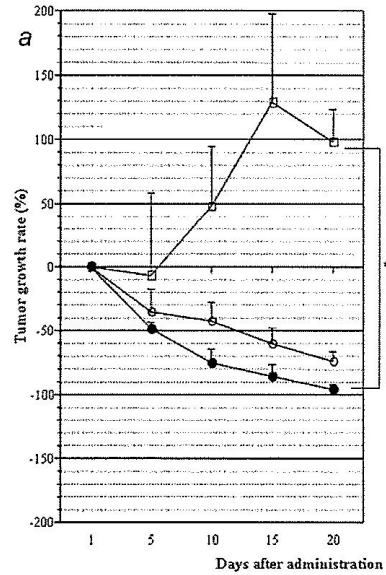


TABLE II - TISSUE CONCENTRATION OF PACLITAXEL IN HEPG2 OR A431 XENOGRAPHS

Time (hr)	Concentration (ng/g)			
	HepG2		A431	
	PTX	PTX/PMBN-preS1	PTX	PTX/PMBN-preS1
4	131 ± 78	1,105 ± 608 ¹	386 ± 57	713 ± 229 ²
8	40 ± 31	268 ± 97 ¹	153 ± 46	204 ± 60 ²
24	nd	nd	6 ± 5	31 ± 24

nd, not detected. Values are given in mean ± SD of samples from 3 mice at each time.
¹*p* < 0.05 versus PTX group. ²No statistical significant difference was shown between PTX and PTX/PMBN-preS1.

(5) HBs 抗原 L 粒子の preS1 と遺伝子を結合したバイオナノ粒子によるヒト肝細胞特異的遺伝子送達と発現

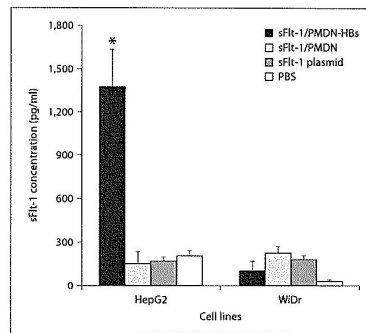
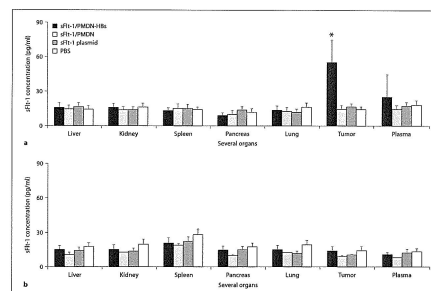
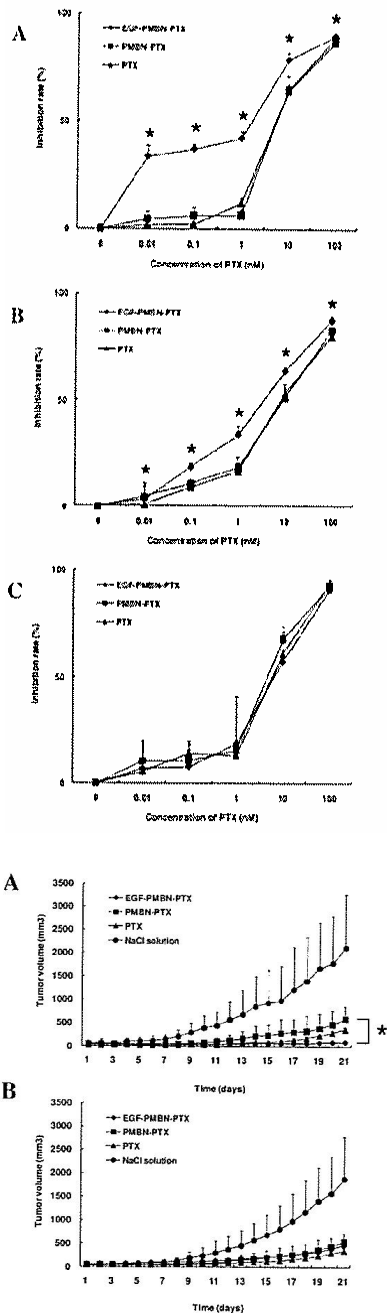


Fig. 2. Selective transfection of cells with sFlt-1/polyMDN-HBs in vitro. The concentration of sFlt-1 in the group transfected with sFlt-1/polyMDN-HBs was significantly higher than in the other groups of HepG2 cells. Mann-Whitney U test. * *p* < 0.05. In contrast, the sFlt-1 concentration was low in all groups of WiDr cells.



(6) 上皮増殖因子結合バイオナノ粒子による in vitro および in vivo での増殖および腫瘍抑制効果



(7) 抗上皮増殖因子受容体抗体結合バイオナノ粒子による増殖および腫瘍抑制効果

抗上皮増殖因子受容体抗体を結合させてパクリタクセルを封入した MPC-ポリマーを細胞あたりに発現している上皮増殖因子受容体の数が異なっている種々の細胞株に in vitro で添加すると、増殖因子受容体数に依存した殺細胞効果が認められた。また、ヒト肺小細胞癌で上皮増殖因子受容体の発現がみとめられない H69 と過剰発現株であるヒト

扁平上皮癌細胞株である A431 をヌードマウス皮下に移植して 5 日間連日上記薬剤を静脈より投与すると、A431 へのみ著明な腫瘍増殖抑制効果が認められた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 17 件)

1. Shimada T., Ueda M., Jinnō H., Chiba N., Wada M., Watanabe J., Ishihara K. and Kitagawa Y., Development of Targeted Therapy with Paclitaxel Incorporated into EGF-conjugated Nanoparticles., *Anticancer Research*, 29, 1009-1014, 2009, 査読有

2. Akita A, Tanimoto A, Jinnō H., Kameyama K, Kuribayashi S. : The clinical value of bilateral breast MR imaging: is it worth performing on patients showing suspicious microcalcifications on mammography? *European Radiology* 10, 2009, 査読有

3. Ueda M., Ito Y, et al., Establishment of combined immune-chemotherapy with systemically administered gemcitabine and intra-portal administration of interleukin-2 in murine Models of liver metastases of pancreatic cancer, *Int. J. Oncol.*, 33, 49-58, 2008, 査読有

4. Miyata R., Ueda M., et al., Selective targeting by hepatitis B surface antigen conjugated with phosphorylcholine-based amphiphilic block copolymer micelles as a biocompatible, drug delivery carrier for treatment of human hepatocellular carcinoma with paclitaxel., *Int. J. Cancer*, 124, 2460-2467, 2008, 査読有

5. Imai E., Ueda M., Kanao K., Kubota T., Hasegawa H., Omae K., Kitajima M.: Risk factors for surgical site infection in gastric and colon surgeries with special reference to their operative approach. *ICHE* in press, 査読有

6. Sugano K, Nakamura S, Ando J, Takayama S, Kamata H, Sekiguchi I, Ubukata M, Kodama T, Arai M, Kasumi F, Hirai Y, Ikeda T, Jinnō H., Kitajima M, Aoki D, Hirasawa A, Takeda Y, Yazaki K, Fukutomi T, Kinoshita T, Tsunematsu R, Yoshida T, Izumi M, Umezawa S, Yagata H, Komatsu H, Arimori N, Matoba N, Gondo N, Yokoyama S, Miki Y.: Cross-sectional analysis of germline BRCA1 and BRCA2 mutations in Japanese patients suspected to have hereditary breast/ovarian cancer. *Cancer Sci.* 99(10) 1967-76, 2008, 査読有

7. Jinnō H., Sakata M, Asaga S, Wada M, Shimada T, Kitagawa Y, Suzuki T, Nakahara T, Kitamura N, Kubo A, Mukai M, Ikeda T, Kitajima M.: Predictors to assess non-sentinel lymph node status in breast cancer patients with sentinel lymph node

metastasis. Breast J. 14(6):551-5.2008,査読有

8.Oguma J.,Ozawa S.,Morikawa Y.,Jfurukawa,T.,Kitagawa Y.,Ueda M.,Kitajima,M.: Knot-tying force during suturing and wound healing in the gastrointestinal tract. J. Surg.Research 140:129-134.2007,査読有

9.Wada M.,Jinno H.,Ueda M.,Ikeda T.,Kitajima M.,Konno T.,Watanabe J.,Ishihara K.: Anticancer Research 27,1431-1436,2007. ,査読有

10.Akatsu T.,Aiura K.,Ito Y.,Ueda M.,Kameyama K.,Kitajima M.: A novel Von Hippel-Lindau case with germline mutation at codon 167(CGG to TGG) having endocrine microadenomatosis of the pancreas. Dig Dis Sci 52:3145-3148.2007. ,査読有

11.Sugiura K., Ozawa S., Kitagawa Y., Ueda M., Kitajima M.: Co-expression of aFGF and FGFR-1 is predictive of a poor prognosis in patients with esophageal squamous cell carcinoma. Oncology Rep. 17,557-564.2007. ,査読有

12.Iwasaki Y.,Ueda M.,Yamada T.,Kondo A.,Seno M.,Tanizawa K.,Kuroda S. Gene therapy of liver tumors with human liver-specific nanoparticel. Cancer gene therapy 14,74-81.2007,査読有

13.Nagaoka T.,Fukuda T.,Yoshida S.,Yu Dongewi.,Kuroda S.,Tanizawa K.,Kondo A.,Ueda M.,Yamada H.,Tada H.,Seno M.: Characterization of bio-nanocapsule as a transfer vector targeting human hepatocyte carcinoma by disulfide linkage modification. Journal of controlled release.10,2007. ,査読有

14.Chiba T.,Ueda M.,The novel immunosuppressant agents targeting activated lymphocytes by biocompatible MPC polymer conjugated with interleukin2. J Surgical Research 39:103-110.2007,査読有

15.Wada M., Jinno H., Ueda M., Ikeda T., Kitajima M., Konno T., Watanabe J., Ishihara K.: Efficacy of an MPC-BMA co-polymer as a nanotransporter for paclitaxel. Anticancer Res in press,査読有

16.Chiba T., Ueda M., Shimada T.,Jiino H.,Watanabe J.,Ishihara K.,Kitajima M.:Development of gene vectors for pinpoint targeting to human hepatocytes by cationically modified polymer complexes. J Surgical Research 39:23-34,2007. ,査読有

17.Ikeda T, Jinno H. Shirane M.: Chemosensitivity-related genes of breast cancer detected by DNA microarray. Anticancer Res. 27(4C):2649-55,2007,査読有

[学会発表](計16件)

1. 宮田量平(東京歯科大学附属市川総合病院

外科), 上田政和, 北川雄光, 安藤暢敏, Paclitaxel を封入した HBs 抗原結合し生体適合性を有する MPC polymer を用いたヒト肝細胞癌に対する抗腫瘍効果の検討、第 108 回日本外科学会定期学術集会、2008 年 5 月 16 日、長崎

2. 日比泰造(慶應義塾大学 外科), 河地茂行, 上田政和, 相浦浩一, 田邊稔, 篠田昌宏, 八木洋, 長谷川康, 島津元秀, 北川雄光, 進行胆嚢癌の予後因子および手術適応の検討、第 108 回日本外科学会定期学術集会、2008 年 5 月 16 日、長崎

3. 田辺稔(慶應義塾大学 外科), 上田政和, 河地茂行, 篠田昌宏, 日比泰造, 小島正之, 半田寛, 丸山正太郎, 山本立真, 高野公德, 北川雄光、肝硬変合併小肝細胞癌に対する小範囲切除 ガイドニードル法により留置した染色フィブリン糊をナビゲーターとした系統的な小範囲肝切除術、第 108 回日本外科学会定期学術集会、2008 年 5 月 15 日、長崎

4. 竹内裕也(慶應義塾大学 医学部外科),上田政和, 北川雄光, リンパ管へのアプローチその新展開 センチネルリンパ節理論を応用したリンパ行性癌微小転移診断と低侵襲個別化治療、第 113 回日本解剖学会、2008 年 3 月 27 日、大分

5. 今井俊(慶應義塾大学 外科), 長谷川博俊, 西堀英樹, 石井良幸, 遠藤高志, 迫田哲平, 金野智浩, 石原一彦, 上田政和, 北島政樹, Paclitaxel 封入抗 EGFR 抗体結合ナノ粒子による殺細胞効果と抗腫瘍効果の検討、第 107 回日本外科学会定期学術集会、2007 年 10 月 5 日、大阪

6. 今井俊(慶應義塾大学 外科), 長谷川博俊, 石井良幸, 遠藤高志, 金野智浩, 石原一彦, 上田政和, 北川雄光、パクリタキセルと抗 EGFR モノクローナル抗体の共役ナノ粒子による抗腫瘍作用の評価(The evaluation of antitumor effect by the nanoparticles conjugated with paclitaxel and anti-EGFR monoclonal antibody)、第 66 回日本癌学会学術総会、2007 年 10 月 3 日、横浜

7. 高橋洋子(慶應義塾大学 医学部一般・消化器外科), 神野浩光, 麻賀創太, 坂田道生, 上田政和, 北川雄光、表皮成長因子受容体に対する温度反応性磁性ナノ粒子 (Thermo-responsive magnetic nanoparticle directed against epidermal growth factor receptor)、第 66 回日本癌学会学術総会、2007 年 10 月 3 日、横浜

8.米澤太作(神戸大学 院・自科), 宍戸卓矢, 上田政和, 妹尾昌治, 多田宏子, 谷澤克行, 黒田俊一, 田中勉, 福田秀樹, 近藤昭彦, 膜透過ペプチド提示バイオナノカプセルを用いる高効率薬剤導入法の開発, 第 59 回日本生物工学会, 2007 年 9 月 25 日、広島

9.三瓶浩史(大阪大学産業科学研究所), 粕谷武史, 殿井裕之, 佐々木康雄, 角矢博保, 鄭周姫, 近藤昭彦, 妹尾昌治, 上田政和, 谷澤克行, 黒田俊一、糖鎖提示型バイオナノカプセルの開発、日本 DDS 研究会、2007 年 6 月 14 日、熊本

10.粕谷武史(大阪大学産業科学研究所), 鄭周姫, 佐々木康雄, 近藤昭彦, 妹尾昌治, 上田政和, 谷澤克行, 黒田俊一、バイオナノカプセルを用いた B 型肝炎ウイルスのヒト肝臓特異的感染機構の解明、日本 DDS 研究会、2007 年 6 月 14 日、熊本

11.佐々木康雄(大阪大学 大学院生命機能研究科), 粕谷武史, 鄭周姫, 近藤昭彦, 妹尾昌治, 上田政和, 黒田俊一, 谷澤克行、バイオナノカプセルの In Vivo イメージングに向けた可視化、日本 DDS 研究会、2007 年 6 月 14 日、熊本

12.殿井裕之(大阪大学産業科学研究所), 粕谷武史, 角矢博保, 鄭周姫, 佐々木康雄, 近藤昭彦, 妹尾昌治, 上田政和, 谷澤克行, 黒田俊一、ホーミングペプチド提示型バイオナノカプセルによる生体内ピンポイント DDS の開発、日本 DDS 研究会、2007 年 6 月 14 日、熊本

13.鄭周姫(大阪大学産業科学研究所), 近藤昭彦, 妹尾昌治, 上田政和, 谷澤克行, 黒田俊一、ヒト肝臓特異的バイオナノカプセルの In Vivo イメージングによる生体内動態解析、日本 DDS 研究会、2007 年 6 月 14 日、熊本

14.八木洋(慶應義塾大学 一般・消化器外科), 上田政和, 神野浩光, 相浦浩一, 妹尾昌治, 多田宏子, 山田秀徳, 北島政樹、FGF 挿入型のヒト組み替え RNase-bFGF を介した腫瘍増殖抑制効果の検討、第 107 回日本外科学会定期学術集会、2007 年 4 月 12 日、大阪

15.倉田直弥(神戸大学 院・自科), 宍戸卓矢, 上田政和, 妹尾昌治, 多田宏子, 谷澤克行,

黒田俊一, 田中勉, 福田秀樹, 近藤昭彦、抗体提示バイオナノカプセルを用いたピンポイントプロテインデリバリーシステムの開発、化学工学会 第 73 年会、2007 年 3 月 17 日、静岡

16.嶋田俊之(慶應義塾大学 医学部外科学教室一般・消化器外科), 上田政和, 和田真弘, 高山伸, 神野浩光, 池田正, 渡邊順司, 金野智浩, 石原一彦, 北島政樹, 上皮増殖因子受容体過剰発現癌に対する EGF 結合 MPC ポリマーによるターゲティング療法の開発、COE 研究報告会、2006 年 5 月 11 日、東京

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

1. 名称: 細胞特異的能動集積性を有する光線力学療法剤

発明者: 上田政和

権利者: 慶應義塾大学

産業財産権の種類: 特願 2008-321500

出願年月日: 2008 年 12 月 17 日

国内外の別: 国内

2. 名称: センチネルリンパ節を検出するための熱応答性磁性体ナノ粒子を含む造影剤

発明者: 上田政和

権利者: 慶應義塾大学

産業財産権の種類: 特願 2007-065435

出願年月日: 2008 年 3 月 14 日

国内外の別: 国内

取得状況(計 0 件)

〔その他〕該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田 政和(UEDA MASAKAZU)

慶應義塾大学・医学部・准教授

研究者番号: 50142419

(2) 研究分担者

神野 浩光(JINNO HIROMITSU)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号: 20216261

(3) 連携研究者